

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2001年1月25日 (25.01.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/05939 A1(51) 国際特許分類:  
15/09, C12P 13/04, C12N 1/00

C12N 1/21, (74) 代理人: 遠山 勉, 外(TOYAMA, Tsutomu et al.); 〒103-0004 東京都中央区東日本橋3丁目4番10号 ヨコヤマビル6階 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/04775

(22) 国際出願日: 2000年7月14日 (14.07.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(30) 優先権データ:  
特願平11/205269 1999年7月19日 (19.07.1999) JP

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 味の素株式会社 (AJINOMOTO CO., INC.) [JP/JP]; 〒104-8315 東京都中央区京橋一丁目15番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 木村英一郎 (KIMURA, Eiichiro) [JP/JP], 伊藤久生 (ITO, Hisao) [JP/JP], 倉橋 修 (KURAHASHI, Osamu) [JP/JP]; 〒210-8681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社 発酵技術研究所内 Kanagawa (JP).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING TARGET SUBSTANCE BY FERMENTATION

(54) 発明の名称: 発酵法による目的物質の製造法

(57) Abstract: A process for producing a target substance by using a microorganism which comprises culturing the microorganism in a medium, thus producing and accumulating the target substance in the medium and collecting the target substance, wherein a variant or a recombinant strain having variation or deletion of  $\sigma$  factor, which acts specifically in the stationary phase, is employed as the microorganism so as to improve the productivity of the target substance.

(57) 要約:

微生物を培地中に培養し、該培地中に目的物質を生成蓄積させ、該目的物質を採取する、微生物を利用した目的物質の製造法において、前記微生物として、定常期に特異的に機能する $\sigma$ 因子が変異又は欠損した変異株又は組換え株を用いることにより、目的物質の生産性を改善する。

WO 01/05939 A1

BEST AVAILABLE COPY

## 明細書

## 発酵法による目的物質の製造法

技術分野

本発明は、微生物を利用した目的物質の製造法に関し、詳しくは、L-アミノ酸、抗生物質、ビタミン、成長因子、生理活性物質などの目的物質を微生物を利用して製造する方法において、目的物質の生産性を改善するための手段を開示するものである。

背景技術

微生物を利用した物質の製造法の代表的なものとして発酵法によるL-アミノ酸の製造法が知られている。L-アミノ酸は、調味料や、食品として用いられるだけでなく、医療を目的とする様々な栄養混合物のコンポーネントとして利用される。さらに、動物用飼料添加物として、製薬業および化学工業における試薬として、微生物によるL-リジンやL-ホモセリンなどのL-アミノ酸産生のための成長因子として利用される。発酵法によってL-アミノ酸を製造できる微生物としては、コリネ型細菌、エシェリヒア属細菌、バチルス属細菌、セラチア属細菌等が知られている。

発酵法によってL-アミノ酸を製造するには、野生型微生物（野生株）を用いる方法、野生株から誘導された栄養要求株を用いる方法、野生株から種々の薬剤耐性変異株として誘導された代謝調節変異株を用いる方法、栄養要求株と代謝調節変異株の両方の性質を持った株を用いる方法等がある。

さらに近年はL-アミノ酸の発酵生産に、組換えDNA技術を用いることが行われてきた。この技術ではL-アミノ酸生合成系酵素をコードする遺伝子を増強することにより宿主微生物のL-アミノ酸生合成系を強化することを、その原理としている。これらの事情については例えば「アミノ酸発酵 学会出版センター」に開示されている。

また、L-アミノ酸以外にも微生物を用いた発酵法で生産されている物質は多

い。例えば抗生物質や、ビタミン等もその例である。これらの物質の発酵生産においても、組換えDNA技術の利用は、目的物質又はその前駆体の生合成系酵素をコードする遺伝子の増強が主なものである。

上記のような微生物の育種技術により、目的物質の生産性は著しく改善されてきている。

一方、微生物の培養においてその生育は、増殖期を経た後、定常期に至る。定常期においては増殖と死滅が平衡となるため、目的物質の生産効率は増殖期に比べて通常低下する。そこで、生産効率を向上させるために、培地や培養方法等の培養条件に関する検討が種々行われている。

また、定常期に特異的に機能する $\sigma$ （シグマ）因子を欠損したエシェリヒア・コリが知られている（Mulvey, M.R. et al., Gene, 73, 337-345 (1988)）が、 $\sigma$ 因子と目的物質の生産性との関係については、検討がなされていない。

#### 発明の開示

本発明は、L-アミノ酸、抗生物質、ビタミン、成長因子、生理活性物質などの目的物質を微生物を利用して製造する方法において、従来の方法と異なる原理によって目的物質の生産性を改善する方法を提供することを課題とする。

本発明者は、上記課題を解決するために鋭意研究を行った結果、定常期に特異的に機能する $\sigma$ 因子を欠損した変異株又は組換え株を用いると、目的物質の生産性が向上することを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち本発明は、

(1) 微生物を培地中に培養し、該培地中に目的物質を生成蓄積させ、該目的物質を採取する、微生物を利用した目的物質の製造法において、前記微生物は、定常期に特異的に機能する $\sigma$ 因子が弱化又は欠損した変異株又は組換え株であることを特徴とする方法；

(2) 前記微生物は、katF遺伝子が変異又は破壊されたことにより定常期に特異的に機能する $\sigma$ 因子を欠損したことを特徴とする(1)の方法；

(3) 前記目的物質がL-アミノ酸である(1)の方法；

(4) 前記微生物がエシェリヒア属細菌又はコリネ型細菌である(1)の方法；

である。

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明により製造される目的物質は、微生物によって生産され得る物質であれば特に制限されず、例えばL-スレオニン、L-リジン、L-グルタミン酸、L-ロイシン、L-イソロイシン、L-バリン、L-フェニルアラニン等の種々のL-アミノ酸が挙げられる。その他にも、グアニル酸、イノシン酸等の核酸類、ビタミン類、抗生物質、成長因子、生理活性物質など、微生物により生合成される物質が挙げられる。また、現在微生物を利用して生産されていない物質であっても、微生物によって生産され得るものであれば本願発明が利用できることはいうまでもない。

本発明に用いる微生物は、目的物質を生産する能力を有する微生物、例えば、従来発酵法による有用物質の生産に用いられている微生物であれば、特に制限されずに使用することができる。また、従来、産業上利用されていない微生物であっても、目的物質を生産する能力を有する限り、本発明を適用することができる。

なお、本明細書において「目的物質を生産する能力」とは、本発明の微生物を培地に培養したときに、培地中又は菌体中に有意な量の目的物質を蓄積する能力をいう。

本発明の微生物は、本来目的物質を生産する能力を有するものであってもよいし、変異法や組換えDNA技術などを利用した育種により目的物質を生産する能力を付与されたものであってもよい。

具体的には、エシェリヒア・コリ等のエシェリヒア属細菌、プレビバクテリウム・ラクトファーマンタム等のコリネ型細菌、バチルス・サブチリス等のバチルス属細菌、セラチア・マルセッセンス等のセラチア属細菌等が挙げられるが、これらに制限されない。

より具体的には以下の菌株が挙げられる。例えば目的物質がL-スレオニンの場合はエシェリヒア・コリVKPM B-3996(RIA 1867)(米国特許第5,175,107号参照)、コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム AJ12318 (FERM BP-1172)(米国特許第5,175,107号参照)等であり、L-リジンの場合はエシェリヒア・コリ AJ1144

2 (NRRL B-12185, FERM BP-1543)(米国特許第4,346,170号参照)、ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ3990 (ATCC31269)(米国特許第4,066,501号参照)等であり、L-グルタミン酸の場合はエシェリヒア・コリ AJ12624 (FERM B P-3853)(フランス特許出願公開第2,680,178号参照)、エシェリヒア・コリ AJ13199 (FERM P-15573)(特開平7-203980号参照)、ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタムAJ12475 (FERM BP-2922)(米国特許第5,272,067号参照)等であり、L-ロイシンの場合はエシェリヒア・コリ AJ11478 (FERM P-5274)(特公昭 62-34397号参照)、ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ3718 (FERM P-2516)(米国特許第3,970,519号参照)等であり、L-イソロイシンの場合はエシェリヒア・コリKX141 (VKPM B-4781)(欧州特許出願公開第519,113号参照)、ブレビバクテリウム・フラバム AJ12149 (FERM BP-759)(米国特許第4,656,135号参照)等であり、L-バリンの場合はエシェリヒア・コリ VL1970 (VKPM B-4411))(欧州特許出願公開第519,113号参照)、ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ12341 (FERM BP-1763)(米国特許第5,188,948号参照)等であり、L-フェニルアラニンの場合は、エシェリヒア・コリ AJ12604 (FERM BP-3579)(欧州特許出願公開第 488,424号参照)、ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ12637 (FERM BP-4160)(フランス特許出願公開第 2,686,898号参照)等である。

本発明に用いる微生物は、目的物質の産生能を有し、かつ、定常期に特異的に機能する $\sigma$ 因子を欠損した変異株又は組換えである。 $\sigma$ 因子は、RNAポリメラーゼを構成するサブユニットの一つであり、RNAポリメラーゼのコア酵素に結合してホロ酵素が形成されると、ホロ酵素は遺伝子のプロモーターを認識することができる。「定常期に特異的に機能する $\sigma$ 因子が弱化した」とは、 $\sigma$ 因子がRNAポリメラーゼのコア酵素に結合してホロ酵素を形成する機能が弱化した場合、又は、ホロ酵素を形成することができたとしても、ホロ酵素が遺伝子のプロモーターを認識する機能が弱化した場合を含む。「定常期に特異的に機能する $\sigma$ 因子を欠損した」とは、細胞内で同 $\sigma$ 因子が産生されない場合、又は、産生されてもプロモーターを認識する活性を有しない場合を含む。

エシェリヒア・コリでは、定常期に特異的に機能する $\sigma$ 因子（以下、「 $\sigma^{70}$ 」ともいう。）は、katF遺伝子（rpoS遺伝子とも呼ばれている）によりコードされ

ており、その塩基配列は明らかにされている (Mulvey, M.R. et al., Nucleic Acids Res., 17 (23), 9979-9991 (1989)、GenBank/EMBL/DDBJ Accession AF082844)。エシェリヒア・コリ K-12株のkatF遺伝子の塩基配列及びコードするアミノ酸配列を、配列表の配列番号3及び4に示す。RpoSを欠損した株は、活性を有するRpoSを発現しないように、katF遺伝子を破壊し、又は同遺伝子に変異を起こさせることによって、取得することができる。

本発明に用いる変異株は、微生物の野生株又は目的物質の生産に好ましい変異を有する変異株を変異処理し、活性を有するRpoSを産生しない変異株を選択することによって得られる。RpoSを産生しない変異株であっても、目的物質の生合成系が完全でないものは、本発明に用いる微生物として好ましくない。変異処理としては、紫外線照射またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NTG) もしくは亜硝酸等の通常変異処理に用いられている変異剤によって微生物を処理する方法が挙げられる。

また、本発明に用いる組換え株は、相同組換えによる遺伝子破壊によって創製することができる。定常期に特異的に機能する $\sigma$ 因子をコードする遺伝子 (katF) の5'末端部及び／又は3'末端部を欠失し、正常に機能しないように改変したkatF遺伝子を含むDNAで微生物を形質転換し、改変したkatF遺伝子と染色体上のkatF遺伝子との間で組換えを起こさせることにより、染色体上のkatF遺伝子を破壊することができる。このような相同組換えによる遺伝子破壊は既に確立しており、直鎖DNAを用いる方法や温度感受性複製制御領域を含むプラスミドを用いる方法などによっても遺伝子破壊を行うことができる。以下に温度感受性複製制御領域を含むプラスミドを用いる方法を説明する。

katF遺伝子の内部を欠失し、正常に機能しないように改変した遺伝子 (欠失型遺伝子) を含むDNAで微生物を形質転換し、欠失型遺伝子と染色体上の排出系遺伝子との間で組換えを起こさせることにより、染色体上のkatF遺伝子を破壊することができる。欠失型遺伝子を、宿主染色体上のkatF遺伝子と置換するには以下のようにすればよい。すなわち、温度感受性複製制御領域と欠失型遺伝子とクローニング用シーケンス等の薬剤耐性を示すマーカー遺伝子とを挿入して組換えDNAを調製し、この組換えDNAで微生物を形質転換し、温度感受性複製制御領

域が機能しない温度で形質転換株を培養し、続いてこれを薬剤を含む培地で培養することにより、組換えDNAが染色体DNAに組み込まれた形質転換株が得られる。

こうして染色体に組換えDNAが組み込まれた株は、染色体上にもともと存在するkatF遺伝子配列との組換えを起こし、染色体上のkatF遺伝子と欠失型遺伝子との融合遺伝子2個が組換えDNAの他の部分（ベクター部分、温度感受性複製制御領域及び薬剤耐性マーカー）を挟んだ状態で染色体に挿入されている。したがって、この状態では正常なkatF遺伝子が優性であるので、形質転換株は活性を有するRpoSを産生する。

次に、染色体DNA上に欠失型遺伝子のみを残すために、2個のkatF遺伝子の組換えにより1コピーのkatF遺伝子を、ベクター部分（温度感受性複製制御領域及び薬剤耐性マーカーを含む）とともに染色体DNAから脱落させる。その際、正常なkatF遺伝子が染色体DNA上に残され、欠失型遺伝子が切り出される場合と、反対に欠失型遺伝子が染色体DNA上に残され、正常なkatF遺伝子が切り出される場合がある。いずれの場合も、温度感受性複製制御領域が機能する温度で培養すれば、切り出されたDNAはプラスミド状で細胞内に保持される。次に、温度感受性複製制御領域が機能しない温度で培養すると、欠失型遺伝子が染色体DNA上に残された場合は、正常なkatF遺伝子を含むプラスミドが細胞から脱落するためRpoSは活性を有しないが、正常なkatF遺伝子が染色体DNA上に残された場合はRpoSが機能する。したがって、非許容温度で薬剤感受性の菌株の染色体の遺伝子構造をPCRで調べることにより、目的とする遺伝子破壊株を選択することができる。

尚、上記のようにしてkatF遺伝子を破壊した後は、遺伝子破壊株にrecA<sup>-</sup>を導入しておく、低温で培養中にプラスミド上のkatF遺伝子が染色体へ再び組み込まれるのを防ぐことができる点で好ましい。

エシェリヒア・コリのkatF遺伝子は、例えば、エシェリヒア・コリの染色体DNAを鋳型とし、配列表の配列番号1及び2に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとするポリメラーゼ・チェイン・ターミネーション法（PCR：polymerase chain reaction；White, T.J. et al., Trends Genet., 5, 18

5 (1989)参照) によって取得することができる。

温度感受性プラスミドとしては、エシェリヒア・コリ等のエシェリヒア属細菌で機能するものとしては、p H S G 4 1 5 及び p H S G 4 2 2 (Hashimoto-Gotoh, T. et al, Gene, 16, 227-235 (1981)) が、ブレヴィバクテリウム・ラクツファーマンタム等のコリネ型細菌で機能するものとしては、p H S 4、p H S 2 2、p H S 2 3 が挙げられる。また、p H S 4 から切り出したコリネ型細菌由来の複製制御領域を含むDNA断片を、エシェリヒア・コリ用のベクターである p H S G 3 9 8 に接続して得られたプラスミド p H S C 4 も、同様に温度感受性プラスミドとして本発明に使用することができる。p H S C 4 は、コリネ型細菌、及びエシェリヒア・コリ中で自律増殖して、宿主にクロラムフェニコール耐性を付与する。p H S C 4 を保持するエシェリヒア・コリ A J 1 2 5 7 1 は、1990年10月11日に通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（郵便番号305-8566 日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号）に受託番号 F E R M P - 1 1 7 6 3 として寄託され、1991年8月26日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、F E R M B P - 3 5 2 4 の受託番号で寄託されている。

これらのうち、エシェリヒア・コリ用の温度感受性プラスミドは、エシェリヒア・コリ細胞中において、約25～37℃では自律増殖できるが、約42℃以上では自律増殖できない。また、コリネ型細菌用温度感受性プラスミドは、コリネ型細菌細胞中において、約10～32℃では自律増殖できるが、約34℃以上では自律増殖できない。

温度感受性複製制御領域を有するDNA断片は、例えば、上記 p H S G 4 1 5 を B a l I で切り出すことによって、又は p H S C 4 を B a m H I と K p n I で切り出すことによって得られる。

尚、上記の各々のプラスミドの構築及びその温度感受性複製制御領域を含む領域の塩基配列は、特公平7-108228号公報に記載されている。

染色体DNAの調製、遺伝子断片とプラスミドとの連結、P C R、プラスミドDNAの調製、DNAの切断及び連結、形質転換、プライマーとして用いるオリゴヌクレオチドの設定等の方法は、当分野によく知られている通常の方法を適用することができる。これらの方法は、Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Mani



atis, T., "Molecular Cloning A Laboratory Manual, Second Edition", Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)等に記載されている。

上記のようにして得られるkatF遺伝子が破壊された微生物は、RpoSを欠損しているので、katFが正常に機能する株に比べて増殖期が長くなり、その結果、目的物質の生産性が向上する。

本発明の微生物は、本発明の効果が損なわれない限り、RpoSを欠損していることに加えて、目的物質の生合成系酵素が増強されているなど、他の性質が付与されていてもよい。また、本発明の微生物は、目的物質の生合成経路から分岐して目的物質以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素の活性が低下あるいは欠損していてもよい。さらに、本発明の微生物は、目的物質の生産にとって好ましい他の性質が付与されていてもよい。

上記のようにして目的物質の生産能力が向上した微生物を培地中に培養し、該培地中に目的物質を生成蓄積せしめ、該培養物から目的物質を採取することにより、目的物質を製造することができる。培養に用いる培地や培養条件は、用いる宿主に応じて適宜選択すればよい。

上記のようにして製造される目的物質は、必要に応じて、菌体抽出液又は培地からイオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、溶媒沈殿等、通常の目的物質の精製法を用いて精製することができる。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。

##### <1> エシェリヒア・コリL-グルタミン酸生産菌のkatF遺伝子破壊株の創製

E. coli AJ13199株の全ゲノムDNAを、斎藤、三浦の方法 (Biochem. Biophys. Acta., 72, 619 (1963)) により調製した。エシェリヒア・コリAJ13199株 (特開平7-203980号参照) は、DL-アスパラギン酸 $\beta$ -ヒドロキサメート耐性株であり、1996年4月18日に工業技術院生命工学工業技術研究所 (郵便番号305-8566 日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号) に受託番号FERM P-15573として寄託され、19

97年2月3日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、受託番号FERM BP-5807が付与されている。

一方、公知のkatF遺伝子の塩基配列に基づいて、配列番号1及び2に示す配列を有する2種のプライマーを作製した。これらを用いてPCR反応を行い、katF遺伝子の増幅を行った。得られたDNAを、ベクターpHSG399（宝酒造(株)製）のEcoRI部位に挿入し、プラスミドp399RPOSを得た。

上記プラスミドp399RPOSを制限酵素AvaIIで完全に切断した後、T4 DNAリガーゼを用いてセルフライゲーションを行い、katF遺伝子の内部を欠失させ、p399 $\Delta$ RPOSを得た。次に、p399 $\Delta$ RPOSの欠失型KatF遺伝子を、エシェリヒア・コリで自律複製可能なプラスミドから取得した自己複製能が温度感受性になった変異型の複製起点を持つプラスミドpHSG415に導入した。具体的には、p399RPOSをEcoRIで消化し、得られた欠失型KatF遺伝子を含む断片を、プラスミドpHSG415（Hachimoto-Gotoh, T. et al, Gene, 16, 227-235 (1981)）のEcoRI部位に挿入し、p415 $\Delta$ RPOSを作製した。

このプラスミドを用いて、エシェリヒア・コリのL-グルタミン酸生産菌であるエシェリヒア・コリAJ13199株を形質転換し、染色体上のkatF遺伝子を欠失型に置換した。具体的には、プラスミドが導入されたAJ13199/p415 $\Delta$ RPOSをLB培地（バクトトリプトン10g、バクトイーストエクストラクト5g、NaCl 5gを1Lの水に含む）で25℃にて6時間振とう培養した後、25 $\mu$ g/mlのカナマイシンを含むLB寒天培地上に撒き、42℃で培養して形成したコロニーをプラスミド組み込み株として取得した。次に、この株から42℃でカナマイシンに対して感受性になった株をレプリカ法により取得した。この感受性株から染色体上のkatF遺伝子の塩基配列を調べ、同遺伝子が欠失型に置換されていることを確認し、これを $\Delta$ RpoS株と命名した。

### <3> katF破壊株によるL-グルタミン酸の生産

AJ13199株（形質転換株）及びAJ13199/ $\Delta$ RpoS株を、L-グルタミン酸生産培地（組成：グルコース40.0g/L、硫酸マグネシウム（別殺菌）1.0g/L、硫酸アンモニウム20.0g/L、リン酸2水素カリウム1.0g/L、硫

酸第一鉄7水和物10.0mg/L、硫酸マンガン5水和物10.0mg/L、バクトイーストエキストラクト2.0g/L、チアミン塩酸塩10.0mg/L、炭酸カルシウム(乾熱殺菌)50.0g/L、pH7.0(KClで調整))で37℃、残糖がなくなるまで培養し、培地中のL-グルタミン酸の量を旭化成(株)製バイオテックアナライザーAS-210により測定した。また、培養後の培地の620nmにおける吸光度(OD<sub>620</sub>)を測定した。これらの結果を表1に示す。

表 1

菌株	L-グルタミン酸(g/L)	OD <sub>620</sub>	培養時間(h)
AJ13199	19.8	0.76	40
ΔRpoS	20.1	0.90	30

#### 産業上の利用可能性

本発明により、目的物質を産生する微生物の増殖期を延長させることができ、その結果、目的物質の生産性を向上させることができる。

## 請求の範囲

1. 微生物を培地中に培養し、該培地中に目的物質を生成蓄積させ、該目的物質を採取する、微生物を利用した目的物質の製造法において、

前記微生物は、定常期に特異的に機能する $\sigma$ 因子が弱化または欠損した変異株又は組換え株であることを特徴とする方法。

2. 前記微生物は、*k a t F*遺伝子の変異又は破壊されたことにより定常期に特異的に機能する $\sigma$ 因子を欠損したことを特徴とする請求項1記載の方法。

3. 前記目的物質がL-アミノ酸である請求項1記載の方法。

4. 前記微生物がエシェリヒア属細菌又はコリネ型細菌である請求項1記載の方法。

1/6

## 配列表

## SEQUENCE LISTING

<110> Ajinomoto Co., Inc. (味の素株式会社)

<120> 発酵法による目的物質の製造法

<130> B635SMOP1034

<141> 2000-07-14

<150> JP 11-205269

<151> 1999-07-19

<160> 4

<210> 1

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 1

gcgcgaattc atgagtcaga atacgctg

28

<210> 2

<211> 28

<212> DNA

2/6

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: primer

&lt;400&gt; 2

gcgcgaattc ggtaatgcgc tcgttaag

28

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 1475

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Escherichia coli

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (287)..(1372)

&lt;400&gt; 3

cgaccgcaga tggccgcggtt gtttatgctg gtaacgcgct gcgcggctac ggtaatctga 60  
 ttatcatcaa acataatgat gattacctga gtgcctacgc ccataacgac acaatgctgg 120  
 tccgggaaca acaagaagtt aaggcggggc aaaaaatagc gaccatgggt agcaccggaa 180  
 ccagttcaac acgcttgcat tttgaaattc gttacaaggg gaaatccgta aaccgctgc 240  
 gttatttgcc gcagcgataa atcggcggaa ccaggctttt gcttga atg ttc cgt 295

Met Phe Arg

1

caa ggg atc acg ggt agg agc cac ctt atg agt cag aat acg ctg aaa 343  
 Gln Gly Ile Thr Gly Arg Ser His Leu Met Ser Gln Asn Thr Leu Lys

5

10

15

gtt cat gat tta aat gaa gat gcg gaa ttt gat gag aac gga gtt gag 391  
 Val His Asp Leu Asn Glu Asp Ala Glu Phe Asp Glu Asn Gly Val Glu

3/6

20	25	30	35	
gtt ttt gac gaa aag ccg tta gta gaa cag gaa ccc agt gat aac gat	439			
Val Phe Asp Glu Lys Pro Leu Val Glu Gln Glu Pro Ser Asp Asn Asp				
40	45	50		
ttg gcc gaa gag gaa ctg tta tcg cag gga gcc aca cag cgt gtg ttg	487			
Leu Ala Glu Glu Glu Leu Leu Ser Gln Gly Ala Thr Gln Arg Val Leu				
55	60	65		
gac gcg act cag ctt tac ctt ggt gag att ggt tat tca cca ctg tta	535			
Asp Ala Thr Gln Leu Tyr Leu Gly Glu Ile Gly Tyr Ser Pro Leu Leu				
70	75	80		
acg gcc gaa gaa gaa gtt tat ttt gcg cgt cgc gca ctg cgt gga gat	583			
Thr Ala Glu Glu Glu Val Tyr Phe Ala Arg Arg Ala Leu Arg Gly Asp				
85	90	95		
gtc gcc tct cgc cgc cgg atg atc gag agt aac ttg cgt ctg gtg gta	631			
Val Ala Ser Arg Arg Arg Met Ile Glu Ser Asn Leu Arg Leu Val Val				
100	105	110	115	
aaa att gcc cgc cgt tat ggc aat cgt ggt ctg gcg ttg ctg gac ctt	679			
Lys Ile Ala Arg Arg Tyr Gly Asn Arg Gly Leu Ala Leu Leu Asp Leu				
120	125	130		
atc gaa gag ggc aac ctg ggg ctg atc cgc gcg gta gag aag ttt gac	727			
Ile Glu Glu Gly Asn Leu Gly Leu Ile Arg Ala Val Glu Lys Phe Asp				
135	140	145		
ccg gaa cgt ggt ttc cgc ttc tca aca tac gca acc tgg tgg att cgc	775			
Pro Glu Arg Gly Phe Arg Phe Ser Thr Tyr Ala Thr Trp Trp Ile Arg				
150	155	160		
cag acg att gaa cgg gcg att atg aac caa acc cgt act att cgt ttg	823			
Gln Thr Ile Glu Arg Ala Ile Met Asn Gln Thr Arg Thr Ile Arg Leu				
165	170	175		
ccg att cac atc gta aag gag ctg aac gtt tac ctg cga acc gca cgt	871			
Pro Ile His Ile Val Lys Glu Leu Asn Val Tyr Leu Arg Thr Ala Arg				

4/6

180	185	190	195	
gag ttg tcc cat aag ctg gac cat gaa cca agt gcg gta gag atc gca				919
Glu Leu Ser His Lys Leu Asp His Glu Pro Ser Ala Val Glu Ile Ala				
	200	205	210	
gag caa ctg gat aag cca gtt gat gac gtc agc cgt atg ctt cgt ctt				967
Glu Gln Leu Asp Lys Pro Val Asp Asp Val Ser Arg Met Leu Arg Leu				
	215	220	225	
aac gag cgc att acc tcg gta gac acc ccg ctg ggt ggt gat tcc gaa				1015
Asn Glu Arg Ile Thr Ser Val Asp Thr Pro Leu Gly Gly Asp Ser Glu				
	230	235	240	
aaa gcg ttg ctg gac atc ctg gcc gat gaa aaa gag aac ggt ccg gaa				1063
Lys Ala Leu Leu Asp Ile Leu Ala Asp Glu Lys Glu Asn Gly Pro Glu				
	245	250	255	
gat acc acg caa gat gac gat atg aag cag agc atc gtc aaa tgg ctg				1111
Asp Thr Thr Gln Asp Asp Asp Met Lys Gln Ser Ile Val Lys Trp Leu				
260	265	270	275	
ttc gag ctg aac gcc aaa cag cgt gaa gtg ctg gca cgt cga ttc ggt				1159
Phe Glu Leu Asn Ala Lys Gln Arg Glu Val Leu Ala Arg Arg Phe Gly				
	280	285	290	
ttg ctg ggg tac gaa gcg gca aca ctg gaa gat gta ggt cgt gaa att				1207
Leu Leu Gly Tyr Glu Ala Ala Thr Leu Glu Asp Val Gly Arg Glu Ile				
	295	300	305	
ggc ctc acc cgt gaa cgt gtt cgc cag att cag gtt gaa ggc ctg cgc				1255
Gly Leu Thr Arg Glu Arg Val Arg Gln Ile Gln Val Glu Gly Leu Arg				
	310	315	320	
cgt ttg cgc gaa atc ctg caa acg cag ggg ctg aat atc gaa gcg ctg				1303
Arg Leu Arg Glu Ile Leu Gln Thr Gln Gly Leu Asn Ile Glu Ala Leu				
	325	330	335	
tta ccg cga gta agt aag cat ctg tca gaa agg cca gtc tca agc gag				1351
Leu Pro Arg Val Ser Lys His Leu Ser Glu Arg Pro Val Ser Ser Glu				



5/6

340                      345                      350                      355  
 gct ggt ttt ttc tgt gca caa taaaaggtcc gaatgcccat cggacctttt 1402  
 Ala Gly Phe Phe Cys Ala Gln

360  
 tattaaggtc aaattaccgc ccatacgcac acaggtaatt aagaatccgg taaaaccgag 1462  
 aatggtcggt aac 1475

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 362

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Escherichia coli

&lt;400&gt; 4

Met Phe Arg Gln Gly Ile Thr Gly Arg Ser His Leu Met Ser Gln Asn  
 1                      5                      10                      15  
 Thr Leu Lys Val His Asp Leu Asn Glu Asp Ala Glu Phe Asp Glu Asn  
 20                      25                      30  
 Gly Val Glu Val Phe Asp Glu Lys Pro Leu Val Glu Gln Glu Pro Ser  
 35                      40                      45  
 Asp Asn Asp Leu Ala Glu Glu Glu Leu Leu Ser Gln Gly Ala Thr Gln  
 50                      55                      60  
 Arg Val Leu Asp Ala Thr Gln Leu Tyr Leu Gly Glu Ile Gly Tyr Ser  
 65                      70                      75                      80  
 Pro Leu Leu Thr Ala Glu Glu Glu Val Tyr Phe Ala Arg Arg Ala Leu  
 85                      90                      95  
 Arg Gly Asp Val Ala Ser Arg Arg Arg Met Ile Glu Ser Asn Leu Arg  
 100                      105                      110  
 Leu Val Val Lys Ile Ala Arg Arg Tyr Gly Asn Arg Gly Leu Ala Leu  
 115                      120                      125  
 Leu Asp Leu Ile Glu Glu Gly Asn Leu Gly Leu Ile Arg Ala Val Glu

6/6

130	135	140
Lys Phe Asp Pro Glu Arg Gly Phe Arg Phe Ser Thr Tyr Ala Thr Trp		
145	150	155
Trp Ile Arg Gln Thr Ile Glu Arg Ala Ile Met Asn Gln Thr Arg Thr		160
	165	170
Ile Arg Leu Pro Ile His Ile Val Lys Glu Leu Asn Val Tyr Leu Arg		175
	180	185
Thr Ala Arg Glu Leu Ser His Lys Leu Asp His Glu Pro Ser Ala Val		190
	195	200
Glu Ile Ala Glu Gln Leu Asp Lys Pro Val Asp Asp Val Ser Arg Met		205
	210	215
Leu Arg Leu Asn Glu Arg Ile Thr Ser Val Asp Thr Pro Leu Gly Gly		220
225	230	235
Asp Ser Glu Lys Ala Leu Leu Asp Ile Leu Ala Asp Glu Lys Glu Asn		240
	245	250
Gly Pro Glu Asp Thr Thr Gln Asp Asp Asp Met Lys Gln Ser Ile Val		255
	260	265
Lys Trp Leu Phe Glu Leu Asn Ala Lys Gln Arg Glu Val Leu Ala Arg		270
	275	280
Arg Phe Gly Leu Leu Gly Tyr Glu Ala Ala Thr Leu Glu Asp Val Gly		285
	290	295
Arg Glu Ile Gly Leu Thr Arg Glu Arg Val Arg Gln Ile Gln Val Glu		300
305	310	315
Gly Leu Arg Arg Leu Arg Glu Ile Leu Gln Thr Gln Gly Leu Asn Ile		320
	325	330
Glu Ala Leu Leu Pro Arg Val Ser Lys His Leu Ser Glu Arg Pro Val		335
	340	345
Ser Ser Glu Ala Gly Phe Phe Cys Ala Gln		350
	355	360

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04775

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N 1/21, C12N 15/09, C12P 13/04, C12N 1/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N 1/21, C12N 15/09, C12P 13/04, C12N 1/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MULVEY M. R. et al., "Nucleotide sequence of katF of Escherichia coli suggests katF protein is a novel", Nucleic Acids Research (1989), Vol.17, No.23, pp.9979-9991	1-4
A	MULVEY M. R. et al., "Cloning and physical characterization of katE and katF required for catalase HP11 expression in Escherichia coli", Gene (1988), Vol.73, No.2, pp.337-345	1-4
A	McCann M. P. et al., "The putative $\sigma$ factor katF has a central role in development of starvation-mediated general resistance in Escherichia coli", Journal of Bacteriology (1991), Vol.173, No.13, pp.4188-4194	1-4
A	TOUATI E. et al., "Are appR and katF the same Escherichia coli gene encoding a new sigma transcription initiation factor?", Res Microbiol. (1991), Vol.142, No.1, pp.29-36	1-4

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
17 August, 2000 (17.08.00)

Date of mailing of the international search report  
05 September, 2000 (05.09.00)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N 1/21, C12N 15/09, C12P 13/04, C12N 1/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N 1/21, C12N 15/09, C12P 13/04, C12N 1/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	MULVEY M.R., et al. "Nucleotide sequence of katF of Escherichia coli suggests katF protein is a novel", Nucleic Acids Research(1989), Vol. 17, No. 23, p. 9979-9991	1-4
A	MULVEY M.R., et al. "Cloning and physical characterization of katE and katF required for catalase HPII expression in Escherichia coli", Gene(1988), Vol. 73. No. 2, p. 337-345	1-4

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17.08.00

国際調査報告の発送日

05.09.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

富永 みどり



4N 9152

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	McCann M.P., et al. "The putative $\sigma$ factor katF has a central role in development of starvation-mediated general resistance in Escherichia coli", Journal of Bacteriology (1991), Vol. 173, No. 13, p. 4188-4194	1-4
A	TOUATI E., et al. "Are appR and katF the same Escherichia coli gene encoding a new sigma transcription initiation factor?", Res Microbiol. (1991), Vol. 142, No. 1, p. 29-36	1-4

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**